

Effects of DOP-PCR amplification and labeling methods on the sensitivity and specificity of metaphase- and array-based comparative genomic hybridizations

著者	坪佐 恭宏
発行年	2005-03-25
その他の言語のタイトル	メタフェーズCGHとアレイCGHの感度と特異度におけるDOP-PCR増幅と標識方法の影響 メタフェーズ CGH ト アレイ CGH ノ カンド ト ト クイド ニ オケル DOP PCR ゾウフク ト ヒョウシ キ ホウホウ ノ エイキョウ
URL	http://hdl.handle.net/10422/565

氏 名 (本籍)	坪 佐 恭 宏 (静岡県)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 327号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成17年3月25日
学 位 論 文 題 目	Effects of DOP-PCR amplification and labeling methods on the sensitivity and specificity of metaphase-and array-based comparative genomic hybridizations (メタフェーズCGHとアレイCGHの感度と特異度におけるDOP-PCR増幅と標識方法の影響)
審 査 委 員	主査 教授 木 村 博 副査 教授 大久保 岩男 副査 教授 佐 藤 浩

論文内容要旨

※整理番号	330	(ふりがな) 氏 名	つばさ やすひろ 坪佐 恭宏
学位論文題目	Effects of DOP-PCR amplification and labeling methods on the sensitivity and specificity of metaphase- and array-based comparative genomic hybridizations (メタフェーズ CGH とアレイ CGH の感度と特異度における DOP-PCR 増幅と標識方法の影響)		
<p>目的</p> <p>CGH は不安定なゲノム配列の領域にある新規癌遺伝子の探究だけでなく、単一腫瘍内での局在による腫瘍細胞の不均一性を解明するために用いられている。一方、正常細胞や異倍体腫瘍細胞の混入、PCRによるDNA増幅、プローブ標識方法などの因子が、CGHのコピー数の増減の感度や特異度に影響していると考えられている。本研究の目的は正常細胞混入、DOP-PCR 増幅、プローブ標識方法〔ニックトランスレーション標識（以下 NT 標識）とランダムプライミング標識（以下 RP 標識）〕の CGH の感度と特異度への影響度を評価することである。</p> <p>方法</p> <p>2 倍体細胞よりもコピー数変化を捉え難い近 4 倍体細胞株である Kato-III と健常男性の末梢血リンパ球を使用した。それぞれ DNA を抽出し、一部は DOP-PCR にて増幅した。</p> <p>DOP-PCR は 2 段階にわけて行った。第一段階としてサーモサイクラー (Model PTC100, MJ Research, inc., Watertown, MA) で低温条件下で 5 サイクルの PCR を行い、第 2 段階ではライトサイクラー (Roche, Mannheim, Germany) で高温条件下で PCR を行った。</p> <p>Kato-III の 2, 3, 4, 6, 7, 9, 11, 13, 18 番染色体を 2 色 FISH 法にて同定した。</p> <p>Kato-III と正常リンパ球の DOP-PCR 増幅しない DNA と増幅した DNA において、Kato-III が細胞数比で 50%、60%、80%、100%となる混合モデルを作成した。</p> <p>DOP-PCR 増幅の有無、細胞数比、プローブ標識方法 (NT 標識と RP 標識) のそれぞれの条件下でメタフェーズ CGH とアレイ CGH を施行した。メタフェーズ CGH のプロトコールは Kamitani ら (Cancer Genet Cytogenet 2002) の方法に従い、アレイ CGH は GenoSensor Array300 (Vysis) を使用した。</p> <p>結果</p> <p>Kato-III の 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 18 番染色体のコピー数を CGH プロファイルと FISH 法により決定した。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

メタフェーズ CGH においては、DOP-PCR 増幅に関係なく正常細胞混入により G/R 比のシフトの程度は低下した。RP 標識においては、コピー数増加の実験値の G/R 比は、FISH で確定したコピー数と正常細胞混入比から計算した理論値に非常に近いシフトを示した。一方、NT 標識においては、1 コピー増加の検出感度は一部で理論値よりも高くなっていた。コピー数減少の G/R 比のシフトは標識方法にかかわらず計算上の理論値より小さかった。1 コピー減少の検出感度は RP 標識の方が高かった。コピー数の変化がない 6、8、9、13q の染色体で偽陽性の結果が出たのは NT 標識の方が多かった。コントロールサンプル（正常細胞/正常細胞）においては、偽陽性のシフトは、NT 標識にのみ一部に見られた。

アレイ CGH において、標識方法に関わらず閾値 $P < 0.01$ では 1 コピーの変化の検出は困難であったが、偽陽性は稀であった。閾値 $T/R > 1.2 / < 0.85$ では検出感度は高くなったが、偽陽性の頻度が増加した。RP 標識では DOP-PCR の有無で検出感度はほとんど変わらなかったが、DOP-PCR を行えば偽陽性率は増加した。NT 標識では、DOP-PCR 増幅によりコピー数減少の検出感度が著しく低下し、偽陽性率 29% で、コピー数の減少と増加が逆の部位も認めた。

アレイ CGH において、RP 標識では、閾値 $P < 0.01$ では DOP-PCR の有無でのローカス毎のコピー数の増減の一致は 15/34 で 44% であった。閾値 $T/R > 1.2 / < 0.85$ では、一致は 53/83 で 64% であった。NT 標識では一致率は低下した。RP 標識において、3 コピー増加と 2 コピー減少の部位では DOP-PCR の有無で完全に一致した。2 コピー増加では 5/7 で 71%、1 コピー減少では 6/10 で 60% の一致率であった。1 コピー増加は一致する部位がなかった。

結論

DOP-PCR 増幅せず、RP 標識で行う CGH で最も良好な感度と特異度を得られた。RP 標識であっても、1 コピーの loss を感知するには十分ではなく、閾値の設定を修正する必要がある。特異度に関しては、偽陽性の gain は NT 標識と DOP-PCR 増幅に多く認められた。DOP-PCR では増幅によるバイアスがあったのではなく、DOP-PCR 増幅サンプルを使用した CGH と使用しなかった CGH での、染色体の部位毎の一致率を減少させる原因となるノイズレベルの上昇があった。

この点は RP 標識により部分的に改善されたことより、マイクロダイセクションのサンプル使用の場合、異倍体細胞の 1 コピーの変化を感知するためには DOP-PCR 増幅でのアレイ CGH は信頼できるツールとなりえる。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	330	氏名	坪 佐 恭 宏
<p>(学位論文審査の結果の要旨)</p> <p>CGH (comparative genomic hybridization) はこれまで多くの腫瘍に対して使用されてきているが、微量サンプルの増幅を目的としたPCRと、これまで用いられてきたNick translation標識の検出感度と特異度に対する影響を検討した報告はほとんどなかった。本研究は、4倍体である胃癌細胞株 Kato-III を使用し、FISH と CGH により絶対的コピー数を決定し、これを基準に DOP-PCR (degenerate oligonucleotide-primed polymerase chain reaction) 増幅と標識方法 (Nick translation 標識と Random priming 標識) による Metaphase CGH と Array CGH の結果に対する影響を比較検討したものである。その結果、(1) 1 コピー変化の検出感度、特異度の検討が可能であった。(2) Metaphase CGH でも Array CGH でも染色体の領域としての増減については DOP-PCR の影響は小さいと考えられた。(3) Random priming 標識の方が Nick translation 標識よりも検出感度は高く、偽陽性率は低かった。</p> <p>本研究により CGH での Random priming 標識は優れた方法であることが示され、1 コピー変化の検出の可能性を指摘したもので、博士 (医学) の学位を授与するに値すると評価された。</p>			
(平成17年 2 月 7 日)			